

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-525104

(P2002-525104A)

(43) 公表日 平成14年8月13日 (2002.8.13)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 39/395	M 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 3/10	4 B 0 6 4
39/395		9/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 3/10		9/10	4 C 0 8 4
9/00		43/00	1 0 7 4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 59 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-572262(P2000-572262)
(86) (22) 出願日 平成11年9月28日 (1999.9.28)
(85) 翻訳文提出日 平成13年3月28日 (2001.3.28)
(86) 国際出願番号 PCT/US 99/22428
(87) 国際公開番号 WO 00/18804
(87) 国際公開日 平成12年4月6日 (2000.4.6)
(31) 優先権主張番号 60/102,098
(32) 優先日 平成10年9月28日 (1998.9.28)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP, US

(71) 出願人 スミスクライン・ビーチャム・コーポレーション
SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19406-0939、キング・オブ・プルシア、スウェードランド・ロード709番
(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T I E 2 アゴニスト抗体

(57) 【要約】

T i e 2 受容体アゴニスト抗体、脈管形成の増強におけるそれらの使用および他の使用を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 モノクローナル抗体15B8または13H10の同定特性を有するTie2受容体アゴニスト抗体。

【請求項2】 モノクローナル抗体15B8である請求項1記載の抗体。

【請求項3】 モノクローナル抗体13H10である請求項1記載の抗体。

【請求項4】 請求項2の抗体の相補性決定領域（CDR）を含むポリペプチド。

【請求項5】 請求項3の抗体のCDRを含むポリペプチド。

【請求項6】 請求項4または5のポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド。

【請求項7】 重鎖および軽鎖を含む改変抗体であって、重鎖および軽鎖のフレームワーク領域が少なくとも1つの選択抗体から誘導され、重鎖および軽鎖の各々の相補性決定領域のアミノ酸配列がモノクローナル抗体15B8または13H10から誘導される改変抗体。

【請求項8】 ヒト化されている請求項7記載の改変抗体。

【請求項9】 ヒトのものである請求項7記載の改変抗体。

【請求項10】 配列番号2に示す重鎖可変領域ポリペプチドおよび配列番号4に示す軽鎖可変領域ポリペプチドを含む抗体。

【請求項11】 配列番号2または配列番号4のポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド。

【請求項12】 配列番号5、6または7に示すアミノ酸配列を有する重鎖CDR。

【請求項13】 請求項12のCDRをコードする単離ポリヌクレオチド。

【請求項14】 配列番号8、9または10に示すアミノ酸配列を有する軽鎖CDR。

【請求項15】 請求項14記載のCDRをコードする単離ポリヌクレオチド。

【請求項16】 配列番号21に示す重鎖可変領域ポリペプチドおよび配列番号14に示す軽鎖可変領域ポリペプチドを含む抗体。

【請求項17】 配列番号21または配列番号14のポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド。

【請求項18】 配列番号15、16または17に示すアミノ酸配列を有する重鎖CDR。

【請求項19】 請求項18のCDRをコードする単離ポリヌクレオチド。

【請求項20】 配列番号18、19または20に示すアミノ酸配列を有する軽鎖CDR。

【請求項21】 請求項20記載のCDRをコードする単離ポリヌクレオチド。

【請求項22】 請求項1または7の抗体および医薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項23】 請求項4または5のポリペプチドおよび医薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項24】 細胞系15B8または13H10の同定特性を有するハイブリドーマ。

【請求項25】 細胞系15B8である請求項24記載のハイブリドーマ。

【請求項26】 細胞系13H10である請求項24記載のハイブリドーマ。

。

【請求項27】 モノクローナル抗体15B8または13H10の同定特性を有する有効量のTie2受容体アゴニスト抗体を投与することを含む哺乳動物における脈管形成の増強方法。

【請求項28】 対象が虚血性疾患の治療を必要とするものである請求項27記載の方法。

【請求項29】 虚血性疾患が心筋梗塞または脳卒中である請求項28記載の方法。

【請求項30】 対象が血管性疾患の治療を必要とするものである請求項27記載の方法。

【請求項31】 血管性疾患が糖尿病である請求項30記載の方法。

【請求項32】 有効量のTie2受容体アゴニスト抗体を投与することを

含む哺乳動物における内皮細胞生存の増強方法。

【請求項33】 有効量のT i e 2 受容体アゴニスト抗体を投与することを
含む哺乳動物における造血細胞増殖または巨核球増殖の増強方法。

【請求項34】 T i e 2 受容体アゴニスト抗体がモノクローナル抗体15
B 8 または1 3 H 1 0 の同定特性を有する請求項3 2 または3 3 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は、米国仮出願番号第60／102,098号（1998年9月28日）の利益を請求する。

【0002】

（技術分野）

本発明は、Tie 2受容体に結合するアゴニストモノクローナル抗体（mAb）および治療目的のかかる抗体の使用に関する。

【0003】

（発明の背景）

脈管形成または新血管新生は、新しい血管または代替血管の発本来のプロセスである。それは、血管構造が胎芽にて樹立される必要かつ正常なプロセスである。脈管形成は、一般に、排卵、月経および創傷治癒の部位を除いて、ほとんどの正常な成体組織では生じない。

【0004】

血液供給の増加は、卒中、心筋梗塞および他の梗塞により引き起こされる虚血状態、ならびに糖尿病または末梢血管性疾患などの疾患により引き起こされる血流不足の状態などの多くの状態において有益である。血管内皮増殖因子および塩基性線維芽細胞増殖因子は、脈管形成を促進することが証明された因子である。血管内皮増殖因子（VEGF）および塩基性線維芽細胞増殖因子についての最近の研究により、これらの因子による脈管形成の促進は、虚血性疾患および血管性疾患において有益であり得ることが証明された（Bauters, C. et al., *Circulation*, 91: 2802-2809, 1995; Bauters, C. et al., *Journal of Vascular Surgery*, 21: 314-24, 1995; Isner, J.M. et al., *Human Gene Therapy*, 7: 959-988, 1996; Takeshita, S., et al., *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 227: 628-635, 1996; Tsurumi, Y., et al., *Circulation*, 96: 382-388, 1997）。

【0005】

近年、脈管形成は、複雑な多細胞現象であるが、特異的なリガンドおよびそれ

らの受容体が重要な役割を果たすことが明らかになった。特に、研究を組み合わせることにより、Tie 2 受容体およびそのリガンドが脈管形成において重要であることが示唆されている。

【0006】

Tie 2 受容体は、マウス胎芽の全ての形成中の血管内皮細胞および心内膜中にて位置決定された (Korhonen et al., Blood 80:2548-2555, 1992)。胎芽発育中の内皮細胞における選択的な発現パターンも証明された (Schlaeger et al., Development 121:1089-1098, 1995)。

【0007】

成体組織において、Tie mRNAは、肉芽組織の増殖性毛細血管が豊富な Tie mRNAを含有している活性な創傷治癒部位を除いては、皮膚において観察することができない (Korhonen et al., Blood 80:2548-2555, 1992)。さらに、Tie 受容体は、転移性黒色腫の血管内皮においても発現される (Kaipainen et al., Cancer Res. 54:6571-6577, 1994)。Tie 受容体発現は、樹立された血管構造においてダウンレギュレートされるが、排卵中の卵巣、創傷および腫瘍（乳癌、悪性黒色腫および腎細胞癌）血管構造にて生じる脈管形成においてはアップレギュレートされ、成体における脈管形成が胎芽脈管形成メカニズムを模倣したものであるという一般的な見解と一致する。

【0008】

Tie 2 ノックアウトを有するか、または、「優性-陰性 (dominant-negative)」 Tie 2 受容体をコードする導入遺伝子を担持するホモ接合マウスにより、Tie 2 受容体が胎芽発育にとって重大な意味を持つことが確認された (Dumont et al., Genes Dev. 8:1897-1909, 1994; Sato et al., Nature 376:70-74, 1995)。これらのマウスでは、胎芽死が血管機能不全により引き起こされ、内皮細胞の数が劇的に減少していた。内皮細胞の分化および血管の in situ 形成である血管形成は、Tie 2 欠損マウスにおいて比較的正常なものと思われる。引き続いて起こる、血管分枝の形成（脈管形成）を引き起こす出芽およびリモデリングが、Tie 2 変異マウス胎芽において劇的に減少した。この出芽および脈管形成の欠損は、特に、脳、神経管および心臓の実質的な成長遅延を引き起こし、生

育力を欠乏させた。これらの結果は、脈管形成におけるT i e 2の重要性を例示している。脈管形成は多くの成長因子により調節されるので、このことは、意義深いことである。興味深いことには、F l k 1 (V E G F受容体) ノックアウトマウスは、T i e 2の分裂よりも早期に生じる血管形成における胎芽致死性欠損を示す。T i e 1受容体の分裂により、非常に異なる表現型が生じ、後に欠損した表現型が生じる；該マウス胎芽は、他の十分に形成された血管構造の完全性の欠損により引き起こされる出血のために発育の後期に死亡する。これらの研究をひとまとめにして考えると、V E G F / F l k 1 およびT i e 系は、連続形式で作用し、T i e 2が脈管形成において重要な役割を有することが示唆される。

【0009】

最近、T i e 2受容体についての2つのリガンドが報告された。アンジオポエチン (Angiopoietin) - 1は、T i e 2と結合してT i e 2のチロシンリン酸化を誘発し、そのインビボでの発現は、血管の発生と極めて密接な関係がある (Davis et al., Cell 87:1161-1169, 1996)。アンジオポエチン-1を欠損するように操作されたマウスは、T i e 2受容体を欠損するマウスにおいてすでに見られた脈管形成を暗示させる脈管形成欠損を示し、これは、アンジオポエチン-1がT i e 2に対する主要な生理学的リガンドであり、T i e 2が重要なインビボ脈管形成作用を有することを証明している (Suri et al., Cell 87:1171-1180, 1996)。アンジオポエチン-2は、相同性スクリーニングにより同定され、T i e 2受容体に対する天然のアンタゴニストであることが示された。アンジオポエチン-2のトランスジェニック過剰発現は、マウス胎芽における血管形成を破壊する (Maisonpierre et al., Science 277:55-60, 1997)。これらの結果をまとめると、脈管形成におけるT i e 2受容体に対する役割が支持される。

【0010】

T i e 1およびT i e 2受容体は、1回膜貫通型チロシンキナーゼ受容体である (T i eは、免疫グロブリン (immunoglobulin) およびE G F相同性ドメインを有するチロシン (Tyrosine) キナーゼ受容体を表す)。それらは、それらの発現がほとんど内皮細胞に制限されているV E G Fに対するこれらの受容体以外の受容体チロシンキナーゼのみである。共に、いくつかの研究グループによりクロ

ーン化され、報告されてきた (Dumont et al., *Oncogene* 8:1293-1301, 1993 ; Partanen et al., *Mol. Cell Biol.* 12:1698-1707, 1992 ; Sato et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9355-9358, 1993)。

【0011】

T i e 受容体は、1個の推定膜貫通領域を有する約125 kDaのタンパク質である。これらの受容体の細胞外ドメインは、E G F様ドメインにおいて見られるシステイン発現のパターンを有する3つの領域；免疫グロブリン様ドメインに対して多少弱い相同性および免疫グロブリン様ドメインの構造的特徴を有する2つの領域；ならびにフィブロネクチン I I I 反復構造に対する相同性を有する3つの領域に独特に分けられる。T i e 2の細胞内の部分は、F G F-R 1、P D G F-R および c - k i t のキナーゼドメインと最も密接に関係している（～40%の同一性）。T i e 2の細胞内部分は、G X G X X G A T P 結合部位コンセンサス配列および典型的なチロシンキナーゼモチーフ（すなわち、H R D L A A R N および D F G L）を包含するチロシンキナーゼの特徴の全てを含んでいる。

【0012】

脈管形成におけるT i e 2受容体の重要性に基づいて、T i e 2受容体アゴニスト活性は、脈管形成を誘発し、疾患特異的治療効果をもたらすと考えられる。明らかに、治療上許容される濃度でインビボで作用するのに十分な活性を有するであろう、T i e 2受容体に対する高親和性の有効なアゴニスト抗体の開発が必要とされている。

【0013】

T i e 2受容体は、C D 3 4 + 細胞、巨核球前駆細胞および巨核球由来の細胞系を包含する造血前駆細胞上で発現される (Kukk et al., *Brit J Haematol.* 98:195-203, 1997 ; Batard et al., *Blood* 87:2212-2220, 1996)。T i e 2受容体は、c - k i t (Chabot et al., *Nature* 335:88, 1988 ; Yarden et al., *EMB O J* 6:3341, 1987) および f l k - 2 (Matthews et al., *Cell* 65:1143, 1991) などの他の造血性増殖因子受容体に対する相同性を有する。T i e 2の発現は、より成熟した造血細胞上では減少したが、巨核球分化の間は細胞の有意なフラ

クション上で維持された (Batard)。これらのデータをまとめると、T i e 2は、初期の前駆細胞上でおよび巨核球系譜の分化の間に作用する造血性増殖因子の受容体であることを示唆している。

【0014】

(発明の概要)

本発明の一の態様は、モノクローナル抗体15B8または13H10の同定特性を有するT i e 2受容体アゴニスト抗体である。

本発明の別の態様は、配列番号2に示す重鎖可変領域ポリペプチドおよび配列番号4に示す軽鎖可変領域ポリペプチドを含む抗体ならびにそれをコードする単離ポリヌクレオチドである。

【0015】

本発明の別の態様は、配列番号5、6または7に示すアミノ酸配列を有する重鎖CDRである。

本発明の別の態様は、配列番号8、9または10に示すアミノ酸配列を有する軽鎖CDRである。

本発明の別の態様は、配列番号21に示す重鎖可変領域ポリペプチドおよび配列番号14に示す軽鎖可変領域ポリペプチドを含む抗体ならびにそれらをコードする単離ポリヌクレオチドである。

【0016】

本発明の別の態様は、配列番号15、16または17に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDRである。

本発明の別の態様は、配列番号18、19または20に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDRである。

本発明の別の態様は、細胞系15B8または13H10の同定特性を有するハイブリドーマである。

【0017】

本発明の別の態様は、有効量の、モノクローナル抗体15B8または13H10の同定特性を有するT i e 2受容体アゴニストを投与することを含む動物における脈管形成の増強方法である。

本発明の別の態様は、有効量のT i e 2受容体アゴニスト抗体を投与することを含む哺乳動物における内皮細胞生存の増強方法である。

本発明の別の態様は、有効量のT i e 2受容体アゴニスト抗体を投与することを含む哺乳動物における造血細胞増殖または巨核球増殖の増強方法である。

【0018】

(発明の詳細な記載)

本明細書において引用した、特許および特許出願を包含するがそれらに限定されるものではない全ての刊行物は、完全に記載されているかのように出典明示により本明細書の一部とする。

本明細書で用いる場合、「脈管形成を増強すること」なる用語は、新しい血管または代替血管の発生（新血管新生）を増加させることを意味する。

本明細書で用いる場合、「アゴニスト活性」なる用語は、T i e 2受容体に結合して、脈管形成を増強する抗体の活性を表す。

本明細書で用いる場合、「治療すること」およびその派生語は、予防的治療、待期的治療または治療的治療を意味する。

【0019】

本発明は、アゴニスト活性により特徴付けられる、T i e 2受容体に対して指向される改変抗体（altered antibody）およびそのフラグメントを包含する種々の抗体を提供する。典型的なT i e 2受容体アゴニスト抗体は、ネズミモノクローナル抗体15B8または13H10である。

【0020】

「抗体」とは、慣用的なハイブリドーマ技法、ファージディスプレイコンビナトリアルライブラリー、免疫グロブリン鎖シャフリング（immunoglobulin chain shuffling）およびヒト化技法により調製することができる免疫グロブリンを表す。また、完全なヒトモノクローナル抗体も包含される。本明細書で用いる場合、「抗体」なる用語は、また、選択宿主細胞中での発現により得ることができる、改変免疫グロブリンコード領域によりコードされるタンパクを表す「改変抗体」も包含する。かかる改変抗体は、操作された抗体（例えば、キメラ抗体またはヒト化抗体）または免疫グロブリン定常領域の全部または一部を欠失している抗

体フラグメント、例えば、Fv、Fab、Fab'またはF(ab')₂などである。これらの抗体産物は、急性および慢性の虚血性疾患および血管機能不全性疾患ならびに他の症状の治療用組成物および医薬組成物に有用であり、この場合、血流の増加が示される。虚血性疾患の例としては、心筋梗塞および脳卒中が挙げられる。血管機能不全性疾患の例としては、糖尿病が挙げられる。

【0021】

「改変免疫グロブリンコード領域」とは、本発明の改変抗体をコードする核酸配列を表す。改変抗体が相補性決定領域を移植した（CDR移植した）抗体またはヒト化抗体である場合、非ヒト免疫グロブリン由来のCDRをコードする配列が、ヒト可変フレームワーク配列を含む第一の免疫グロブリンパートナー中に挿入される。所望により、第一の免疫グロブリンパートナーは、第二の免疫グロブリンパートナーと有効に連結されていてもよい。

【0022】

「第一の免疫グロブリンパートナー」とは、本来の（すなわち、天然の）CDRコード領域がドナー抗体のCDRコード領域に置き換えられているヒトフレームワークまたはヒト免疫グロブリン可変領域をコードする核酸配列を表す。ヒト可変領域は、免疫グロブリン重鎖、軽鎖（または両方の鎖）、そのアナログまたは機能的フラグメントであってもよい。抗体（免疫グロブリン）の可変領域内に位置するかかるCDR領域は、当該技術分野で知られている方法により決定することができる。例えば、Kabat et al., in “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987) には、CDRの位置決定についての規則が開示されている。さらに、CDR領域／構造を同定するのに有用なコンピュータプログラムが知られている。

【0023】

「第二の免疫グロブリンパートナー」とは、第一の免疫グロブリンパートナーが、フレーム中で、または任意の慣用リンカー配列により融合される（すなわち、有効に連結される）タンパクまたはペプチドをコードするもう1つのヌクレオチド配列を表す。好ましくは、それは、免疫グロブリン遺伝子である。第二の免

疫グロブリンパートナーとしては、目的とする同一抗体（すなわち、第一および第二の改変抗体が同一起源由来のものである同種抗体）または付加（すなわち、異種）抗体の定常領域全体をコードする核酸配列が挙げられる。それは、免疫グロブリン重鎖または軽鎖（または単一ポリペプチドの一部としての両方の鎖）であってもよい。第二の免疫グロブリンパートナーは、特定の免疫グロブリンクラスまたはイソタイプに限定されない。さらに、第二の免疫グロブリンパートナーは、F a bまたはF (a b)₂（すなわち、適当なヒト定常領域またはフレームワーク領域の別個の部分）において見られるような免疫グロブリン定常領域の一部を含んでいてもよい。かかる第二の免疫グロブリンパートナーは、また、例えば、ファージディスプレイライブラリーの一部としての、宿主細胞の外表面上に露出した膜内在性タンパクをコードする配列、または、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼなどの、分析的もしくは診断的検出用のタンパクをコードする配列を含んでもよい。

【0024】

F v、F c、F d、F a b、F a b'またはF (a b')₂なる用語は、それらの標準的な意味をもって用いられる。例えば、Harlow et al., in "Antibodies A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, (1988) を参照のこと。

【0025】

本明細書で用いられる場合、「操作された抗体」とは、一のタイプの改変抗体、すなわち、選択されたアクセプター抗体の軽鎖および／または重鎖可変ドメインの一部が、選択されたエピトープに対して特異性を有する1つ以上のドナー抗体に由来する類似部分により置き換えられている全長合成抗体（例えば、抗体フラグメントとは対照的なキメラ抗体またはヒト化抗体）を示す。例えば、かかる分子としては、未修飾軽鎖（またはキメラ軽鎖）と会合したヒト化重鎖またはその逆のものにより特徴付けられる抗体が挙げられる。操作された抗体は、また、ドナー抗体結合特異性を保持するための、アクセプター抗体軽鎖および／または重鎖可変ドメインフレームワーク領域をコードする核酸配列の改変により特徴付けられる。これらの抗体は、アクセプター抗体由来の1つ以上のCDR（好まし

くは、全部) の本明細書に記載のドナー抗体由来のCDRとの置換を含むことができる。

【0026】

「キメラ抗体」とは、アクセプター抗体由来の軽鎖および重鎖定常領域と会合したドナー抗体由来の天然の可変領域(軽鎖および重鎖)を含む一のタイプの操作された抗体を表す。

【0027】

「ヒト化抗体」とは、非ヒトドナー免疫グロブリン由来のCDRを有しており、該分子の残りの免疫グロブリン由来の部分が1つ以上のヒト免疫グロブリン由来のものである一のタイプの操作された抗体を表す。さらに、フレームワーク支持残基は、結合親和性が保存されるように改変されていてもよい。例えば、Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86, 10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9, 421 (1991) を参照のこと。さらにまた、本明細書に記載しているように、付加残基が、ドナー抗体のアゴニスト活性が保存されるように改変されていてもよい。

【0028】

「ドナー抗体」なる用語は、第一の免疫グロブリンパートナーにその可変領域、CDRもしくは他の機能的フラグメントまたはそのアナログの核酸配列を与えて、改変免疫グロブリンコード領域を生じさせ、ドナー抗体に特徴的な抗原特異性および中和活性を有する発現された改変抗体を生じさせるモノクローナル抗体または組換え抗体を表す。本発明における使用に適したドナー抗体は、15B8および13H10と命名されたネズミアゴニストモノクローナル抗体である。

【0029】

「アクセプター抗体」なる用語は、ドナー抗体とは異種のモノクローナル抗体または組換え抗体であって、その重鎖および/または軽鎖フレームワーク領域および/またはその重鎖および/または軽鎖定常領域またはV領域サブファミリーコンセンサス配列をコードする核酸配列の全部または一部を第一の免疫グロブリンパートナーに与えるものをいう。好ましくは、ヒト抗体がアクセプター抗体である。

【0030】

「CDR」は、免疫グロブリン重鎖および軽鎖の超可変領域である抗体の相補性決定領域と定義される。例えば、Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4th Ed., U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987) を参照のこと。免疫グロブリンの可変領域には3つの重鎖CDRまたはCDR領域および3つの軽鎖CDRまたはCDR領域がある。かくして、本明細書で用いられる場合、「CDR」は、3つの重鎖CDR全てまたは3つの軽鎖CDR全て、または適当な場合には、重鎖CDR全ておよび軽鎖CDR全ての両方を表す。

【0031】

CDRは、抗原またはエピトープへの抗体の結合のための接触残基の大部分を提供する。本発明の目的のCDRは、ドナー抗体可変重鎖および軽鎖配列由来のものであり、天然のCDRのアナログを包含し、該アナログは、それらの起源であるドナー抗体と同一の抗原結合特異性および／またはアゴニスト能を有しているかまたは保持しており、しかもなお、抗原に対する親和性の増大を示す。アナログを得るための典型的なプロセスは、Hoogenboom, *Trends in Biotechnology* 15, 62-70 (1997) ; Barbas et al., *Trends in Biotechnology* 14, 230-234 (1996) ; およびWinter et al., *Ann. Rev. Immunol.* 12, 433-455 (1994) により論評されており、Irving et al., *Immunotechnology* 2, 127-143 (1996) により開示されているファージディスプレイ技法による親和性成熟法である。

【0032】

「抗原結合特異性またはアゴニスト能を有する」なる用語は、例えば、mAb 15B8または13H10は、特定レベルのアゴニスト活性により特徴付けられるが、適当な構造環境において15B8または13H10の核酸配列によりコードされるCDRは、より低い活性またはより高い活性を有してもよいことを意味する。かかる環境における15B8または13H10のCDRは、それにもかかわらず、15B8または13H10と同様のエピトープを認識するであろうと考えられる。

【0033】

「機能的フラグメント」は、フラグメントの起源である抗体と同一の抗原結合特異性および／またはアゴニスト能を保持する部分的な重鎖または軽鎖可変配列（例えば、免疫グロブリン可変領域のアミノ末端またはカルボキシ末端でのマイナーな欠失を有するもの）である。

【0034】

「アナログ」は、少なくとも1つのアミノ酸により修飾されたアミノ酸配列であって、ここで、該修飾は、化学的なものであってもよいし、または、数個（すなわち、10個以下）のアミノ酸および対応する核酸配列の置換もしくは転位であってよく、該修飾は、アミノ酸配列に、未修飾配列の生物学的特性、例えば、抗原特異性および高親和性を保持させることができる。典型的な核酸アナログとしては、置換により、CDRコード領域内またはその周辺で特定のエンドヌクレアーゼ制限部位を形成するように構築することができるサイレント変異体が挙げられる。

【0035】

アナログは、対立遺伝子変種として発生することもある。「対立遺伝子変異または修飾」とは、本発明のアミノ酸またはペプチド配列をコードする核酸の改変である。かかる変異または修飾は、遺伝暗号における縮重によるものであってもよいし、または所望の特性を与えるように意図的に操作されたものであってもよい。これらの変異または修飾は、いずれものコードされるアミノ酸配列の改変を引き起こすものであってもよいし、または引き起こさないものであってもよい。

【0036】

「エフェクター物質」なる用語は、改変抗体、および／またはドナー抗体の天然もしくは合成軽鎖または重鎖またはドナー抗体の他のフラグメントが慣用手段により会合され得る非タンパクキャリアー分子を表す。かかる非タンパクキャリアーとしては、診断分野にて用いられる慣用のキャリアー、例えば、ポリスチレンまたは他のプラスチックビーズ、多糖類、例えば、BIAcore（ファルマシア（Pharmacia））系にて用いられるようなもの、または、医薬分野にて有用な、かつ、ヒトおよび動物への投与に安全な他の非タンパク物質が挙げられる。他のエフェクター物質としては、重金属原子または放射性同位体をキレート化する

るためのマクロサイクルが挙げられる。かかるエフェクター物質、例えば、ポリエチレングリコールは、また、改変抗体の半減期を延長するのに有用でもある。

【0037】

本発明の抗体、改変抗体およびフラグメントを構築するのに用いるためには、ウシ、ヒツジ、サル、ニワトリ、齧歯類（例えば、ネズミおよびラット）などの非ヒト種を用い、ヒトTie2受容体またはそれ由来のペプチドエピトープを提示して所望の免疫グロブリンを生成することができる。慣用のハイブリドーマ技法を用いて、Tie2受容体に対する非ヒトmAbを分泌するハイブリドーマ細胞系が得られる。次いで、かかるハイブリドーマは、実施例セクションに記載するように結合およびアゴニスト活性についてスクリーニングされる。別法として、完全なヒトmAbは、当業者に知られている技法により生成することができ、本発明で用いることができる。

【0038】

本発明の典型的なアゴニストmAbは、キメラ分子またはヒト化分子の開発に用いることができるネズミ抗体であるmAb 15B8および13H10である。15B8および13H10 mAbは、ヒトTie2受容体に対するアゴニスト活性により特徴付けられ、結果的に受容体のシグナル伝達の活性化により脈管形成が増強される。これらのmAbは、各々、ハイブリドーマ細胞系15B8および13H10により産生される。

【0039】

本発明は、また、二価フラグメントとしてTie2受容体に対して指向されるmAb由来のFabフラグメントまたはF(ab')₂フラグメントの使用を包含する。これらのフラグメントは、Tie2受容体にてアゴニスト活性を有する作用剤として有用である。Fabフラグメントは、軽鎖全体および重鎖のアミノ末端部分を含有する。F(ab')₂フラグメントは、2つのFabフラグメントをジスルフィド結合により結合して形成されるフラグメントである。mAb 15B8および13H10ならびに他の同様の高親和性抗体は、慣用手段、例えば、適当なタンパク分解酵素であるパパインおよび／またはペプシンを用いるmAbの開裂により、または、組換え法により得ることができるFabフラグメントお

よびF(a b')₂フラグメントの起源を提供する。これらのF a bおよびF(a b')₂フラグメントは、それ自体、治療薬、予防薬または診断薬として、ならびに、本明細書に記載の組換え抗体またはヒト化抗体の生成に有用な可変領域およびCDR配列を包含する配列のドナーとして有用である。

【0040】

F a bおよびF(a b')₂フラグメントは、コンビナトリアルファージライブラリー（例えば、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994) を参照のこと）を介して、または、免疫グロブリン鎖シャフリング（例えば、Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992) を参照のこと）を介して構築することができ、ここで、選択された抗体（例えば、3 G 9）由来のF dまたはv_H免疫グロブリンは、軽鎖免疫グロブリンのレパートリーv_L（またはv_K）と会合して新しいF a bを形成する。逆に、選択された抗体由来の軽鎖免疫グロブリンは、重鎖免疫グロブリンのレパートリーv_H（またはF d）と会合して新しいF a bを形成する。T i e 2受容体アゴニストF a bは、mAb 15 B 8または13 H 10のF dを軽鎖免疫グロブリンのレパートリーと会合させることにより得ることができる。それゆえ、鎖シャフリング技法により固有の配列（ヌクレオチドおよびアミノ酸）を有する中和F a bを回収することが可能である。

【0041】

mAb 15 B 8または13 H 10は、ドナー抗体の抗原結合特異性により特徴付けられる種々の改変抗体を設計して取得するのに有用な、可変重鎖および／または軽鎖ペプチド配列、フレームワーク配列、CDR配列、機能的フラグメント、およびそのアナログ、ならびに、それらをコードする核酸配列などの配列を提供することができる。

【0042】

可変軽鎖および重鎖ペプチド配列をコードする本発明の核酸配列またはそのフラグメントは、また、CDRまたはフレームワーク領域をコードする核酸配列内の特異的な変化の突然変異誘発的導入に、および、得られた修飾または融合核酸配列の発現用プラスミドへの取込みに有用でもある。例えば、フレームワークおよびCDRコード領域のヌクレオチド配列におけるサイレント置換を用いて、突

然変異誘発したCDRおよび／またはフレームワーク領域の挿入を容易にする制限酵素部位を作成することができる。これらのCDRコード領域は、本発明のヒト化抗体の構築用いることができる。

【0043】

15B8重鎖可変領域の核酸配列およびアミノ酸配列を配列番号1に記載する。この領域に由来するCDRアミノ酸配列を配列番号5、6および7に記載する。

15B8軽鎖可変領域の核酸配列およびアミノ酸配列を配列番号2に記載する。この領域に由来するCDRアミノ酸配列を配列番号8、9および10に記載する。

【0044】

アミノ酸7で始まる13H10重鎖可変領域の核酸およびアミノ酸配列を配列番号11に記載する。この領域に由来するCDRアミノ酸配列を配列番号15、16および17に記載する。13H10重鎖可変領域の完全なアミノ酸配列を配列番号2に記載する。

13H10軽鎖可変領域の核酸およびアミノ酸配列を配列番号13に記載する。この領域に由来するCDRアミノ酸を配列番号18、19および20に記載する。

【0045】

遺伝暗号の縮重を考慮して、ドナー抗体の抗原特異性を有する、本発明の可変重鎖および軽鎖アミノ酸配列およびCDR配列ならびにその機能的フラグメントおよびアナログをコードする種々のコード配列を構築することができる。第二の免疫グロブリンパートナーと有効に組み合わせた場合には、可変軽鎖ペプチド配列またはCDRをコードする本発明の単離核酸配列またはそのフラグメントを用いて、本発明の改変抗体、例えば、キメラ抗体もしくはヒト化抗体、または他の操作された抗体を生成することができる。

【0046】

本明細書に記載の改変抗体（複数可）の一部をコードする単離核酸配列に加えて、他のかかる核酸配列、例えば、本来のCDRコード配列に対して相補性を

有するかまたはCDRコード領域周辺の修飾ヒトフレームワーク領域に対して相補性を有するものは、本発明により包含されることに注意すべきである。有用なDNA配列としては、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で該DNA配列にハイブリダイズするこれらの配列が挙げられる。T. Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982), pp. 387-389 を参照のこと。かかるストリンジェントハイブリダイゼーション条件の一例は、65℃で4XSSCでハイブリダイズし、次いで、65℃で1時間、0.1XSSCで洗浄することである。別法として、典型的なストリンジェントハイブリダイゼーション条件は、42℃での50%ホルムアミド、4XSSCである。好ましくは、これらのハイブリダイズするDNA配列は、少なくとも約18ヌクレオチド長、すなわち、ほぼCDRの大きさである。

【0047】

改変免疫グロブリン分子は、キメラ抗体およびヒト化抗体などの操作された抗体を包含する改変抗体をコードすることができる。所望の改変免疫グロブリンコード領域は、ヒトフレームワークまたはヒト免疫グロブリン可変領域などの第一の免疫グロブリンパートナーに挿入される、Tie2受容体抗体、好ましくは、本発明により提供されるような高親和性アゴニスト抗体の抗原特異性を有するペプチドをコードするCDRコード領域を含有する。

【0048】

好ましくは、第一の免疫グロブリンパートナーは、第二の免疫グロブリンパートナーに有効に連結される。第二の免疫グロブリンパートナーは、上記で定義されており、目的の第二の抗体領域、例えば、Fc領域をコードする配列を包含してもよい。第二の免疫グロブリンパートナーは、また、軽鎖または重鎖定常領域がインフレームでまたはリンカー配列により融合される別の免疫グロブリンをコードする配列を包含してもよい。Tie2受容体の機能的フラグメントまたはアナログに対して指向される操作された抗体は、同抗体との結合を増強させるように設計することができる。

【0049】

第二の免疫グロブリンパートナーは、また、該第二の免疫グロブリンパートナ

一が慣用手段により有効に連結することができる非タンパクキャリアー分子を包含する上記定義のエフェクター物質と会合することができる。

【0050】

第二の免疫グロブリンパートナー、例えば、抗体配列とエフェクター物質との間の融合または連結は、適当な手段により、例えば、慣用的な共有結合またはイオン結合、タンパク融合、または異種一二価の架橋剤、例えば、カルボジイミド、グルタルアルデヒドなどにより行うことができる。かかる技法は、当該技術分野にて知られており、慣用的な化学および生化学のテキストに開示されている。

【0051】

さらに、第二の免疫グロブリンパートナーとエフェクター物質との間に所望量のスペースを単に提供するだけの慣用的なリンカー配列を改変免疫グロブリンコード領域中に構築することもできる。かかるリンカーの設計は、当業者によく知られている。

【0052】

さらに、本発明の分子のシグナル配列は、当業者に知られている技法により修飾して発現を増強することができる。

【0053】

好ましい改変抗体は、 V_H および V_L 鎖などの mAb 15B8 または 13H10 の抗原特異性を有する可変重鎖および／または軽鎖ペプチドまたはタンパク配列を含有する。本発明の別の所望の改変抗体は、ネズミ抗体分子 15B8 または 13H10 の重鎖および／または軽鎖の可変領域の CDR の少なくとも 1 つ、好ましくは、全てを含有するアミノ酸配列により特徴付けられ、残りの配列は、ヒト由来のもの、またはその機能的フラグメントもしくはアナログである。

【0054】

さらなる実施態様において、本発明の改変抗体は、それに付加因子を付着させたものであってもよい。例えば、組換え DNA 技法を用いて、完全抗体分子の Fc フラグメントまたは CH_2CH_3 ドメインが酵素または他の検出可能な分子（すなわち、ポリペプチドエフェクターまたはリポーター分子）により置き換えられているが、ただし、完全抗体分子の二量体特性は保持されている本発明の改変

抗体を生成することができる。

【0055】

第二の免疫グロブリンパートナーは、また、T i e 2 受容体に対する抗原特異性を有するCDR含有配列とは異種の非免疫グロブリンペプチド、タンパク、またはそのフラグメントに有効に連結していてもよい。得られたタンパクは、発現して抗原特異性および非免疫グロブリンの特徴の両方を示す。この融合パートナーの特徴は、例えば、他の結合ドメインもしくは受容体ドメインなどの機能的特徴、または、融合パートナーがそれ自体治療用タンパクである場合には治療的特徴、または付加抗原的特徴であってもよい。

【0056】

本発明の別の所望のタンパクは、全長重鎖および軽鎖またはその別個のフラグメント、例えば、F a bまたはF (a b') 2フラグメント、重鎖二量体またはその最小组換えフラグメント、例えば、F vを有する完全抗体分子、または一本鎖抗体 (S C A) または選択されたドナーmA b (例えば、1 5 B 8または1 3 H 1 0 mA b) と同一の特異性を有する他の分子を含んでもよい。かかるタンパクは、改変抗体の形態で用いてもよいし、または、その非融合形態で用いてもよい。

【0057】

第二の免疫グロブリンパートナーが、免疫グロブリンフレームワークまたは定常領域のイソタイプまたはクラスのようなドナー抗体とは異なる抗体に由来する場合には必ず、操作された抗体が得られる。操作された抗体は、1つの起源、例えば、アクセプター抗体由来の免疫グロブリン定常領域および可変フレームワーク領域、ならびにドナー抗体、例えば、1 5 B 8または1 3 H 1 0 mA b由来の1以上の（好ましくは、全ての）CDRを含むことができる。さらに、核酸レベルまたはアミノ酸レベルでのアクセプターmA b軽鎖および／または重鎖可変ドメインフレームワーク領域の改変またはドナーCDR領域の改変、例えば、欠失、置換、または付加は、ドナー抗体抗原結合特異性を保持するために行うことができる。

【0058】

かかる操作された抗体は、T i e 2 受容体mAbの可変重鎖および／または軽鎖の一方（または両方）（上記のように修飾されていてもよい）または1つ以上の重鎖もしくは軽鎖CDRを用いるように設計される。本発明の操作された抗体は、アゴニスト活性を示す。

【0059】

かかる操作された抗体としては、選択されたヒト免疫グロブリンもしくはサブタイプのフレームワークを含有するヒト化抗体、またはT i e 2 受容体mAb機能的フラグメントと融合したヒト重鎖および軽鎖定常領域を含有するキメラ抗体を挙げることができる。適当なヒト（または他の動物）アクセプター抗体は、ドナー抗体のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列に対する相同性により、K A B A T R データベース、L o s A l a m o s データベース、およびS w i s s P r o t e i n データベースなどの慣用のデータベースから選択されるものであってよい。ドナー抗体のV領域フレームワークに対する相同性またはV領域サブファミリーコンセンサス配列（アミノ酸をベースとする）により特徴付けられるヒト抗体は、ドナーCDR挿入用の重鎖可変フレームワーク領域を提供するのに適している。軽鎖可変フレームワーク領域を与える能力を有する適当なアクセプター抗体は、同様の方法で選択することができる。アクセプター抗体重鎖および軽鎖は、同一のアクセプター抗体を起源とする必要はないことに注意すべきである。

【0060】

好ましくは、異種フレームワークおよび定常領域は、ヒト免疫グロブリンクラスおよびイソタイプ、例えば、I g G（サブタイプ1～4）、I g M、I g A、およびI g Eから選択される。I g G 1, k および I g G 4, k が好ましい。特に好ましくは、I g G 4, k である。最も好ましくは、エフェクター機能の低下を引き起こす重鎖定常領域において変異S 2 2 8 P および L 2 3 5 E（P E 変異）を含有するI g G 4 サブタイプ変種である。このI g G 4 サブタイプ変種は、I g G 4 P E として知られている。米国特許第5, 624, 821号および第5, 648, 260号を参照のこと。

【0061】

アクセプター抗体は、ヒト免疫グロブリンタンパク配列だけを含む必要はない。例えば、ヒト免疫グロブリン鎖の一部をコードするDNA配列が、ポリペプチドエフェクターまたはリポーター分子などの非免疫グロブリンアミノ酸配列をコードするDNA配列と融合した遺伝子を構築することができる。

【0062】

特に好ましいヒト化抗体は、選択されたヒト抗体配列のフレームワーク領域に挿入された15B8または13H10 mAbのCDRを含有する。アゴニストヒト抗体については、15B8または13H10抗体重鎖および／または軽鎖可変領域由来の1個、2個、または、好ましくは、3個のCDRを選択されたヒト抗体配列のフレームワーク領域に挿入して、ヒト抗体の本来のCDRを置換する。

【0063】

好ましくは、ヒト化抗体において、ヒト重鎖および軽鎖の両方における可変ドメインは、1つ以上のCDR置換により操作された。6個全部のCDRまたは5個以下のCDRの種々の組合せを用いることが可能である。好ましくは、6個全部のCDRが置換される。軽鎖としてヒトアクセプター抗体由来の未修飾軽鎖を用いてヒト重鎖におけるCDRのみを置換することが可能である。さらに別法として、適合する軽鎖は、慣用的な抗体データベースによって別のヒト抗体から選択されてもよい。操作された抗体の残部は、適当なアクセプターヒト免疫グロブリン由来のものであってもよい。

【0064】

かくして、操作されたヒト化抗体は、好ましくは、天然ヒト抗体またはそのフラグメントの構造を有し、有効な治療的使用、例えば、心筋梗塞もしくは脳卒中などの虚血性疾患の治療または糖尿病のような血管機能不全性疾患の治療に必要とされる特性の組合せを有する。

【0065】

操作された抗体が、ドナー抗体の特異性および高親和性に必ずしも影響を及ぼさずに、可変ドメインアミノ酸の変化によりさらに修飾されていてもよい（すなわち、アナログであってもよい）ことは、当業者に理解されよう。重鎖および軽

鎖アミノ酸は、可変ドメインフレームワークもしくはCDRのいずれかまたはその両方において他のアミノ酸により置換され得ると考えられる。これらの置換は、ドナー抗体または特定のサブグループ由来のコンセンサス配列により提供され得る。

【0066】

さらに、定常領域を改変して、本発明の分子の選択特性を増強または低下させることができる。例えば、二量体化、Fc受容体への結合、補体結合能および活性化能（例えば、Angal et al., Mol. Immunol, 30, 105-108 (1993)、Xu et al., J. Biol. Chem, 269, 3469-3474 (1994)、Winter et al., EP 307434-B を参照のこと）。

【0067】

キメラ抗体である改変抗体は、フレームワーク領域を包含する非ヒトドナー抗体重鎖および軽鎖可変領域全体を両方の鎖のヒト免疫グロブリン定常領域を伴って提供することにより上記ヒト化抗体と異なる。本発明のヒト化抗体に対して付加的な非ヒト配列を保持するキメラ抗体は、ヒトにおいて有意な赤芽球増殖応答を引き起こすことができると考えられる。かかる抗体は、心筋梗塞もしくは脳卒中などの虚血性疾患の予防および治療または糖尿病のような血管機能不全性疾患の治療に有用である。

【0068】

好ましくは、mAb 15B8もしくは13H10または他の適当なドナーmAbの可変軽鎖および／または重鎖配列およびCDRおよびそれらをコードする核酸配列は、以下のプロセスによって、本発明の改変抗体、好ましくは、ヒト化抗体の構築に利用される。同一または類似の技法を用いて本発明の他の実施態様を得ることができる。

【0069】

選択されたドナーmAb、例えば、ネズミ抗体15B8または13H10を産生するハイブリドーマは、慣用的にクローン化され、その重鎖および軽鎖可変領域のDNAは、当業者に知られている技法により、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor L

aboratory (1989) に開示されている技法により得られる。ドナーmAb結合特異性を保持するのに必要とされるアクセプターmAb軽鎖および／または重鎖可変ドメインフレームワーク領域の少なくともCDRコード領域およびそれらの部分を含有する可変重鎖および軽鎖領域、ならびにヒト免疫グロブリン由来の抗体鎖の残りの免疫グロブリン由来の部分は、ポリヌクレオチドプライマーおよび逆転写酵素を用いて得られる。CDRコード領域は、既知のデータベースを用いて、他の抗体と比較することにより同定される。

【0070】

次いで、マウス／ヒトキメラ抗体を調製し、結合能についてアッセイすることができる。かかるキメラ抗体は、非ヒトドナー抗体V_HおよびV_L領域全体を、両方の鎖のヒトIg定常領域と一緒に含有する。

【0071】

ヒト抗体由来の重鎖可変領域の相同フレームワーク領域は、コンピューターデータベース、例えば、KABAT_Rを用いて同定され、V領域フレームワークに対する相同性または15B8もしくは13H10に対するV領域サブファミリーコンセンサス配列（アミノ酸をベースとした）により特徴付けられるヒト抗体は、アクセプター抗体として選択される。ヒト抗体フレームワーク内にCDRコード領域を含有する合成重鎖可変領域の配列は、フレームワーク領域における任意のヌクレオチド置換を用いて制限部位を取り込むように設計される。次いで、この設計された配列は、長い合成オリゴマーを用いて合成される。別法として、設計された配列は、重複オリゴヌクレオチドにより合成し、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により増幅させ、エラーを修正することができる。適当な軽鎖可変フレームワーク領域は、同様に設計することができる。

【0072】

ヒト化抗体は、キメラ抗体由来ものであってもよいし、または、好ましくは、適当には、選択された重鎖および軽鎖フレームワーク内に、重鎖および軽鎖由来のドナーmAb CDRコード領域を挿入することにより合成してもよい。別法として、本発明のヒト化抗体は、標準的な突然変異誘発技法を用いて調製することができる。かくして、得られたヒト化抗体は、ヒトフレームワーク領域および

ドナーmAb CDRコード領域を含有する。次いで、フレームワーク残基を操作することができる。得られたヒト化抗体は、組換え宿主細胞、例えば、COS、CHOまたは黒色腫細胞中で発現させることができる。

【0073】

慣用的な発現ベクターまたは組換えプラスミドは、宿主における複製および発現および／または宿主からの分泌を制御する能力を有する慣用の調節配列を有効に会合して改変抗体に対してこれらのコード配列を配置することにより産生される。調節配列としては、プロモーター配列、例えば、CMVまたはラウス肉腫ウイルスプロモーター、および他の既知の抗体由来ものであってもよいシグナル配列が挙げられる。同様に、相補的な抗体軽鎖または重鎖をコードするDNA配列を有する第二の発現ベクターを生成することができる。好ましくは、この第二の発現ベクターは、できる限り確実に各ポリペプチド鎖が機能的に発現されるように、コード配列および選択マーカーに関する以外は第一の発現ベクターと同一である。別法として、改変抗体の重鎖および軽鎖コード配列は、1個のベクター上に存在してもよい。

【0074】

選択された宿主細胞は、第一および第二のベクターを用いて慣用技法により同時トランスフェクトされて（または、1個のベクターにより単にトランスフェクトされて）、組換えまたは合成の軽鎖および重鎖の両方を含む本発明のトランスフェクト宿主細胞を生じる。次いで、トランスフェクト細胞を慣用技法により培養して、本発明の操作された抗体を生成する。組換え重鎖および／または軽鎖の両方の会合を含むヒト化抗体を、ELISAまたはRIAなどの適当なアッセイにより培養物からスクリーニングする。同様の慣用技法を用いて、本発明の他の改変抗体および分子を構築することができる。

【0075】

本発明の方法および本発明の組成物の構築に用いられるクローニングおよびサブクローニング工程に適したベクターは、当業者により選択され得る。例えば、アマシャム（Amersham）またはファルマシア（Pharmacia）などの供給元から市販されているpUC19のようなpUCシリーズのクローニングベクターを用い

ることができる。さらに、容易に複製する能力を有しており、豊富なクローニング部位および選択遺伝子（例えば、抗生物質耐性）を有しており、容易に操作されるいずれものベクターをクローニングに用いることができる。かくして、クローニングベクターの選択は、本発明において制限要因ではない。

【0076】

同様に、本発明の操作された抗体の発現に用いられるベクターは、当業者により慣用のベクターから選択され得る。該ベクターは、また、選択された宿主細胞における異種DNA配列の複製および発現を指向する選択された調節配列（例えば、CMVまたはラウス肉腫ウイルスプロモーター）を含有することもできる。これらのベクターは、操作された抗体または改変免疫グロブリンコード領域をコードする上記DNA配列を含有する。さらに、該ベクターは、容易な操作のために所望の制限部位の挿入により修飾された選択された免疫グロブリン配列を取り込むことができる。

【0077】

発現ベクターは、また、異種DNA配列の発現の増幅に適した遺伝子、例えば、哺乳動物のジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子（DHFR）により特徴付けられる。他の好ましいベクター配列としては、ポリAシグナル配列、例えば、ウシ成長ホルモン（BGH）由来のポリAシグナル配列、およびベータグロビンプロモーター配列（ベータグロプロ（betaglopro））が挙げられる。本発明に有用な発現ベクターは、当業者によく知られている技法により合成することができる。

【0078】

かかるベクターの成分、例えば、レプリコン、選択遺伝子、エンハンサー、プロモーター、シグナル配列などは、市販の供給源または天然の供給源から得てもよいし、または、選択された宿主における組換えDNAの産物の発現および／または分泌を指向するのに用いるための既知手段により合成してもよい。哺乳動物、細菌、昆虫、酵母および真菌類発現の技術分野において種々のタイプが知られている他の適当な発現ベクターもまた、この目的のために選択され得る。

【0079】

本発明はまた、操作された抗体またはその改変免疫グロブリン分子のコード配

列を含有する組換えプラスミドでトランスフェクトされた細胞系を包含する。これらのクローニングベクターのクローニングおよび他の操作に有用な宿主細胞もまた慣用的なものである。しかしながら、最も望ましくは、クローニングベクターの複製および本発明の改変抗体の構築における他の工程のために、種々のイー・コリ (*E. coli*) 株からの細胞が用いられる。

【0080】

本発明の操作された抗体または改変抗体の発現に適した宿主細胞または細胞系は、好ましくは、CHO、COS、線維芽細胞（例えば、3T3）および骨髓性細胞などの哺乳動物細胞であり、より好ましくは、CHOまたは骨髓性細胞である。ヒト細胞を用いることができ、これにより、該分子をヒトグリコシル化パターンで修飾することができる。別法として、他の真核細胞系を用いることもできる。適当な哺乳動物宿主細胞の選択ならびに形質転換、培養、増幅、スクリーニングおよび生成物の製造および精製の方法当該技術分野で知られている。例えば、上掲のSambrook et al., を参照のこと。

【0081】

細菌細胞は、本発明の組換えFabの発現に適した宿主細胞として有用であることが判明した（例えば、Plueckthun, A., Immunol. Rev., 130, 151-188 (1992) を参照のこと）。しかしながら、細菌細胞において発現されるタンパクの、変性形態もしくは不適當に折り畳まれた形態または非グリコシル化形態となる傾向により、細菌細胞において産生される組換えFabは、抗原結合能の保持についてスクリーニングしなければならない。細菌細胞により発現される分子が正しく折り畳まれた形態で産生された場合、この細菌細胞は、望ましい宿主であろう。例えば、発現に用いられる種々のイー・コリ株は、バイオテクノロジーの分野において宿主細胞としてよく知られている。種々のバシラス・サチリス (*B. subtilis*) 株、ストレプトマイセス株、他のバシラス株などを用いることもできる。

【0082】

望ましい場合、当業者に知られている酵母細胞の株、ならびに昆虫細胞、例えば、ショウジョウバエ (*Drosophila*) および鱗翅目 (*Lepidoptera*)、およびウ

ウイルス発現系もまた宿主細胞として利用可能である。例えば、Miller et al., Genetic Engineering, 8, 277-298, Plenum Press (1986) およびそこに引用されている文献を参照のこと。

【0083】

本発明のベクターを構築することができる一般的な方法、本発明の宿主細胞を産生するのに必要なトランスフェクション方法、およびかかる宿主細胞からの本発明の改変抗体を産生させるのに必要な培養方法は、全て、慣用的な技法である。同様に、本発明の改変抗体は、産生されるとすぐに、硫酸アンモニウム沈降法、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動法などを包含する標準的な方法に従って、細胞培養内容物から精製される。かかる技法は、当該技術の技能の範囲内であり、本発明を限定するものではない。

【0084】

さらにもう1つのヒト化抗体発現方法は、米国特許第4,873,316号に開示されているような、トランスジェニック動物における発現を利用することができる。これは、遺伝子導入により哺乳動物に取込んだ場合に雌の乳中に所望の組換えタンパクを産生させる該動物のカゼインプロモーターを用いる発現系に関する。

【0085】

操作された抗体は、所望の方法により発現されるとすぐに、適当なアッセイの使用によりインビトロ活性について実験される。現在のところ、表面プラスモン共鳴を用いて、Tie 2 受容体に対する操作された抗体の定量的および定性的結合を評価する。さらに、Matrigel 血管新生モデルのような他のインビトロアッセイを用いてアゴニスト活性を測定した後に、次なるヒト臨床研究を行って、通常のクリアランスメカニズムにもかかわらず、体内における操作された抗体の持続性を評価することができる。

【0086】

15B8または13H10から調製したヒト化抗体について記載した方法に従って、当業者は、本明細書に記載の他のドナー抗体、可変領域配列およびCDRペプチドからヒト化抗体を構築することもできる。操作された抗体は、操作された抗体のレシピエントにより潜在的に「自己」と認識される可変領域フレームワ

ークを用いて生成することができる。可変領域フレームワークに対する修飾は、レシピエントに対する免疫原性のはっきりと感知できる増加を伴わずに、抗原結合およびアゴニスト活性を増加させるように行うことができる。かかる操作された抗体は、心筋梗塞または脳卒中などの虚血性疾患についてヒトを有効に処置することができるし、または糖尿病のような血管機能不全性疾患を治療することもできる。かかる抗体は、これらの症状の診断に有用でもある。

【0087】

本発明は、また、アゴニスト活性を有する有効量のT i e 2受容体モノクローナル抗体を投与することを含む、哺乳動物、特に、ヒトにおける脈管形成の増強方法に関する。該m A bとしては、本明細書に記載の一以上の操作された抗体もしくは改変抗体またはそのフラグメントが挙げられる。

【0088】

本発明の分子の使用により誘発される治療応答は、T i e 2受容体への結合および続く脈管形成プロセスに対するアゴニスト活性により生じる。かくして、本発明の分子は、治療に適した調製物および製剤における場合、心筋梗塞もしくは脳卒中などの虚血性疾患または糖尿病のような血管機能不全性疾患に対して感受性があるかまたは該疾患を経験しているヒトに非常に望ましい。

【0089】

本発明は、また、有効量のT i e 2受容体アゴニスト抗体を投与することを含む哺乳動物における内皮細胞生存の増強方法に関する。

本発明は、また、有効量のT i e 2受容体アゴニスト抗体を投与することを含む哺乳動物における造血細胞増殖または巨核球増殖の増強方法に関する。

【0090】

本発明の方法に使用されるm A bとしては、本明細書に記載の一以上の抗体もしくは改変抗体またはそのフラグメントが挙げられる。特に、本発明の方法に用いられるT i e 2受容体アゴニスト抗体は、m A b 15 B 8または13 H 10の同定特性を有する。

【0091】

本発明の改変抗体、抗体およびフラグメントはまた、本発明の操作された抗体

が指向される症状を引き起こす他のマーカー（エピトープ）と反応性のある他の抗体、特に、ヒトmAbと一緒に用いることもできる。

【0092】

T i e 2受容体に対するアゴニスト抗体は、天然リガンドと同一の治療的利用能を有するが、長い半減期およびそれによるインビボ活性の延長という利点を有する。かくして、これらのアゴニストを用いて、受容体／リガンド結合により引き起こされる生物学的カスケードを活性化することができる。T i e 2受容体アゴニスト抗体の利点としては、リガンドよりも少量の投与量の抗体を投与することができること、アゴニスト抗体をベースとする医薬の投与がより容易でその回数が少ないこと、および精製がより容易なことが挙げられる。

【0093】

本発明のT i e 2受容体アゴニスト抗体は、医薬組成物に製剤化することができる、成熟タンパクについて開示されたと同様に投与することができる。例えば、国際特許出願公開W090/02762（1990年3月22日）を参照のこと。一般に、これらの組成物は、治療上有効量の本発明のアゴニスト抗体および医薬上許容される担体を含む。適当な担体は、当業者によく知られており、例えば、生理食塩水が挙げられる。別法として、かかる組成物としては、本発明のタンパクを配合した慣用のデリバリー系も挙げられる。所望により、これらの組成物は、他の有効成分を含むいてもよい。

【0094】

本発明の治療薬は、適当な内用経路により投与ことができ、必要な場合、例えば、1日間～約3週間の間1日1～3回の程度から毎週1回または2週間に1回の程度の頻度で繰り返すことができる。好ましくは、アゴニスト抗体は、治療に用いた場合、リガンドよりも少ない回数投与される。投与量および治療機関は、ヒト循環における本発明の分子の相対期間に関係しており、治療される症状および患者の一般的健康状態に依存して当業者により調節することができる。

【0095】

本明細書にて用いる場合、「医薬」なる用語は、本発明の獣医学的用途を包含する。「治療上有効量」なる用語は、選択された症状の軽減に有用な、受容体ア

ゴニスト抗体の量を表す。本発明のこれらの治療組成物を投与して正常な受容体リガンドの作用を模倣することができる。

【0096】

本発明の治療薬の投与形態は、該薬剤を宿主にデリバリーするいずれの適当な経路であってもよい。本発明の改変抗体、抗体、操作された抗体、およびそのフラグメント、ならびに医薬組成物は、非経口投与、すなわち、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与または鼻腔内投与に特に有用である。

【0097】

本発明の治療薬は、医薬上許容される担体中に有効成分として有効量の本発明の操作された（ヒト化）抗体を含有する医薬組成物として調製することができる。本発明の組成物において、注射用形態の、操作された抗体を含有する、好ましくは、生理学的pHで緩衝化された水性懸濁液または水溶液が好ましい。非経口投与用組成物は、一般に、本発明の操作された抗体の溶液または医薬上許容される担体（好ましくは、水性担体）に溶解したそのカクテルを含む。種々の水性担体、例えば、0.4%生理食塩水、0.3%グリシンなどを用いることができる。これらの溶液は、無菌であり、一般に微粒子物質を含んでいない。これらの溶液は、慣用的な周知の滅菌技法（例えば、濾過）により滅菌できる。該組成物は、pH調節剤および緩衝化剤などの生理学的条件に近づけるのに必要とされる医薬上許容される補助剤を含有してもよい。かかる試薬製剤中の本発明の抗体の濃度は、幅広く、すなわち、約0.5重量%未満から、通常、約1重量%または少なくとも約1重量%から15または20重量%程度まで変動することができ、選択された個々の投与形態に従って、主として、流体容量、粘度などに基づいて選択される。

【0098】

かくして、本発明の筋肉注射用医薬組成物は、滅菌緩衝水1mLおよび本発明の改変抗体約1ng～約100mg、例えば、約50ng～約30mg、または、より好ましくは、約5mg～約25mgを含有するように調製することができる。同様に、本発明の静脈注射用医薬組成物は、滅菌リンゲル溶液約250mLまでおよび本発明の改変抗体約1mg～約30mg、好ましくは、5mg～約2

5mgを含有するように調製することができる。実際の非経口投与用組成物の調製方法は、よく知られており、当業者に明らかであろうし、例えば、“Remington's Pharmaceutical Science”, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania により詳細に開示されている。

【0099】

本発明の治療薬は、医薬調製物における場合、単位投与形態であるのが好ましい。適当な治療上有効量は、当業者が容易に決定することができる。ヒトまたは他の動物において貧血症を有効に治療するためには、1回につき体重1kg当たり本発明のタンパクまたは抗体約0.01mg～約20mgの投与量を非経口投与、好ましくは、静脈内または筋肉内投与する。かかる用量は、必要な場合、応答期間の間、医師により適当な場合に選択された適当な時間間隔で繰り返すことができる。

【0100】

本発明は、ここで以下の特定の非限定的な実施例により記載される。

【0101】

実施例1

Tie2アゴニストモノクローナル抗体の調製およびスクリーニング

マウス(Balb/cおよびC57BL/6のF1ハイブリッド)をRIBIアジュバント中の組換えTie2細胞外ドメイン-Fc融合体で皮下投与により免疫し、次いで、同じもので追加免疫した。別法として、Tie2受容体-Fc融合DNAを用いてマウスを免疫し、RIBIアジュバント中のタンパクで追加免疫した。最終免疫から3～4日後に脾摘出術を行った。マウス脾細胞を用いて標準的な方法(Zola, H. Ed., Monoclonal Antibodies, CRC Press Inc. (1987))によりハイブリドーマを調製した。陽性のハイブリドーマを限界希釈法によりクローン化した。

【0102】

イムノアッセイ

得られた抗Tie2 mAbの特異性を調べるために、96ウェルプレートでTie2-Fcでコーティングし、ブロックした。以下のインキュベーションの

全てを室温でシェーカーインキュベーター中で行った。ウェルを洗浄した後、T i e 2 - F c またはアッセイバッファーおよびm A b / ハイブリドーマ上清を20 μ g / m l のヒトI g G 1 の存在下で添加し（抗F c m A b を除くため）、60分間インキュベートした。ウェルを洗浄した後、アッセイバッファー中のE u ³⁺ 標識抗マウス抗体を60分間添加し、該ウェルを洗浄し、次いで、エンハンサー（W a l l a c）を添加し、室温で5分間インキュベートし、蛍光を測定した。全ての陽性のハイブリドーマは、T i e 2 への結合を示した。

【0103】

B I A c o r e 結合特性による抗体の選択

B I A c o r e を用いて、野生型T i e 2 受容体の外部ドメインに結合するハイブリドーマおよび一次クローンを選択した。抗体は、それらのT i e 2 - F c への結合能について、B I A c o r e 装置を用いて表面プラスモン共鳴により評価した。ウサギ抗マウスI g G F c 特異的抗体をセンサーチップ表面上に固定し、m A b を注入し、屈折率単位（R U ; R U は、結合することができる各タンパクの量の直接的な測定値である）を記録し、次いで、T i e 2 - F c またはI g G を注入し、R U を記録した。表面を0.1 M リン酸15 μ l の注入により再生した。このT i e 2 - F c またはI g G およびモノクローナル抗体の逐次添加をやぎ抗ヒトI g G F c 特異的センサーチップ表面上で繰り返した。2つのハイブリドーマ上清は、高親和性抗体の存在を示した。生成されたハイブリドーマ細胞系および抗体を15 B 8 および13 H 1 0 と命名した。

【0104】

M a b の精製

モノクローナル抗体15 B 8 および13 H 1 0 を、製造者の説明書に従ってプロテイン-Aクロマトグラフィーにより、選択されたハイブリドーマ上清から精製した。M a b は、S D S - P A G E により純度>95%であった。

【0105】

モノクローナル抗体のアフィニティ測定

精製したm A b のアフィニティをB I A c o r e にて測定した。流速10 μ l / 分で、m A b （H B S バッファーで希釈した）をウサギ抗マウスI g G F c

表面上に注入し、次いで、バッファーを流してRUを記録した。次いで、HBSバッファーで希釈したTie2-Fcを120秒間注入し、次いで、バッファーを240秒間流し、センサーチップ表面を0.1Mリン酸15u1で再生した。BIAcoreソフトウェアを会合-解離フェーズ分析に用いた。ネズミモノクローナル抗体を可溶性の単量体Tie2受容体に結合させた。オン速度(k_{ass})およびオフ速度(k_{diss})を算出した。これらを一緒にして平衡定数(K_D)を算出して、mAb 15B8について0.24 nMおよびmAb 13H10について3.1 nMが得られる。

【0106】

実施例2

Tie2アゴニストモノクローナル抗体の機能的スクリーニング

Tie2受容体についての全細胞活性アッセイ

HEL細胞(ATCC # TIB180)を、懸濁培養として2mMグルタミンおよび10%FBSで補足したRPMI-1640培地中、 $1 \sim 5 \times 10^5$ mlで培養する。実験の16~36時間前に、必要な数の細胞を0.5%FBS/RPMI培地中にて継代培養する。実験当日、細胞を収穫し、0.5%FBS RPMI中細胞 $0.5 \sim 1.0 \times 10^7$ 個の密度で再懸濁し、6ウェルプレートに2~3ml/ウェルでプレーティングする。

【0107】

別法として、ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC) (ワシントン州カークランドのセル・システムズ(Cell Systems))を該アッセイに用いることができる。継代2~12のHUVECを、10%血清および内皮細胞増殖因子で補足したCS-C培地(セル・システムズ)中、6ウェルプレートに細胞 2×10^5 および 1×10^6 個/ウェルでプレーティングする。24時間後、培地を、2%血清だけで補足したCS-C培地と交換し、細胞を一夜培養し、翌日アッセイに用いる。

【0108】

細胞を適当な濃度のリガンドまたは抗体で10分間処理する(リガンドの正確な曝露時間および濃度は、実験条件に関して経験的に決定しなければならない)ウェルの内容物をロッカー上で簡単に混合し(約30秒)、次いで、37℃でイ

ンキュベートする。各実験について、ゲルごとに少なくとも1つの対照があるように適当な対照実験を行う（例えば、10レーンゲルについて、8つまでの実験処理系を流し、1つのレーンに対照を流し、1つのレーンにマーカーを流す）。適当な対照は、分析された活性に依存している。アゴニスト作用については、未処理対照をベースライン比較に用いる。リン酸化のアンタゴニストまたは阻害物質については、対応量のアゴニストのみで刺激された培養物（例えば、培養されたリウマチ様線維芽細胞からの調整培地）を用いる。

【0109】

5～15分間のインキュベーション時間の最後に、プレートを氷上に置く。HEL細胞をピペットにより収穫する。HUVECからの培地を取り出し、冷PBSと交換し、該細胞を、ポリスマンまたはセルスクレーパーを用いて機械的にプレート表面から外す。細胞を4℃で遠心沈澱させ、培地を吸引する。細胞ペレットを冷PBSで洗浄し、再度、遠心分離し、PBS上清を抜き出し、管／細胞ペレットをドライアイス／エタノール浴中に浸す。細胞ペレットを氷上に取り出し、僅かに解凍させる。該ペレットを溶解バッファー（RIPA溶解バッファー：50mM Tris-HCl, pH7.5、150mM NaCl、1.0%NP-40、0.5%デオキシコレート、0.1%SDS＋阻害物質：1mMオルトバナジウム酸ナトリウム、1mMフッ化ナトリウム、1mM EDTA、＋プロテアーゼ阻害物質Sigma Mammalian細胞プロテアーゼ阻害物質カクテル（#P8340）またはPMSF、1mMアプロチニンおよびロイペプチン10μg/mlの混合物）500μlに再懸濁させる。懸濁液を中程度設定で5パルスの間音波処理し、氷上に戻す。ホモジネートを遠心分離して、未溶解細胞を除去し、上清を微量遠心管に移し、氷上に維持する。

【0110】

Tie2受容体のリン酸化状態を、以下に詳細に記載するように（Harlow, E., and Lane, D. P., Antibodies - a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1988）、Tie2受容体の免疫沈降、電気泳動による単離、および抗ホスホチロシンAbによる検出により測定する。SH-PTP2に対する抗体を用いてTie2受容体を沈澱させる代替アッセイを行った。

Tie 2 抗体 (TIE 2 ポリクローナ抗体、Santa Cruz Biotechnology Cat. # sc-324) 約7ugを各溶解物に添加し、各試料を4℃で混合しながら1時間インキュベートする。プロテインAまたはプロテインGアガローススラリー20ulを添加し、試料を4℃で混合しながらさらに1時間インキュベートする。アガロース/抗体複合体を微量遠心管中、2000~5000rpmおよび4℃で2分間ペレット化する。上清を注意深く吸引し、ペレットを冷溶解バッファー1mlに再懸濁し、再度、遠心分離する。この洗浄段階をさらに2回繰り返す。最終吸引後、1X SDS-PAGE 試料バッファー (レムリ (Laemli)) + 2.5% 2-メルカプトエタノール40ulを添加する。該試料をボルテックスし、3分間沸騰させる。7.5% SDS/ポリアクリルアミドゲル上で30ulを走らせる。次いで、ウェスタンブロッティングのために製造者の説明書に従ってゲルをニトロセルロースまたはPVD F膜に移す。

【0111】

プロットをPBS 0.05% tween-20で洗浄し、次いで、室温で1時間、5%脱脂粉乳/PBS/tweenでブロックする。次いで、プロットを、PBS/0.05% tween中1ug/mlの抗ホスホチロシン抗体 (例えば、Santa Cruz Biotech # SC508またはUpstate Biotech # 05-321) と一緒に1時間インキュベートする。次いで、プロットをPBS/tweenで4回、毎回5分間洗浄する。プロットを、PBS/tween中での製造者により推奨された希釈度の抗マウス-HRPコンジュゲート第二抗体と一緒に1時間インキュベートする。プロットをPBS/tweenで4回、毎回5分間洗浄する。最終洗浄後、プロットをECL法 (アマシャム (Amersham)) またはいくつかの等価な方法により展開させる。

【0112】

十分な画像を得た後、プロットを0.05% Tween 20-PBSで5分間洗浄し、次いで、100mM 2-メルカプトエタノール-1% SDS-62.5mM Tris-HCl、pH6.8を用いて抗体を、50℃で30分間、時折攪拌しながらストリップさせる。プロットを0.05% Tween 20-PBSで

再度洗浄する。第二プロービングのための調製において、プロットを5%脱脂乳PBS/tweenで、室温で1時間ブロックし、次いで、200 ng/mlの抗Tie 2抗体-3%脱脂乳PBS/tweenと一緒に1時間インキュベートする。プロットをPBS/tweenで4回、毎回5分間洗浄し、次いで、抗ウサギHRP抗体コンジュゲートと一緒にインキュベートし、製造者の説明書に従ってPBS/tweenで1時間希釈する。プロットをPBS/tweenで4回、毎回5分間洗浄し、ECL法により画像を展開させる。

【0113】

デンシトメーターまたはグラフィックプログラム（例えば、Image Quant - Molecular Dynamics）を用いて、各プロットをスキャンする。Tie 2バンドを単離し、各レーンについて「ボックスアウト」（boxed out）する。Tie 2染色およびその対応ホスホチロシン染色の両方に関して各試料の画素容量または比較測定を分析する。さらに、各試料に関して同一規模の適当なバックグラウンド領域を調べる。バックグラウンドについて調節した後、試料の対応Tie 2染色と比較したホスホチロシン染色の割合としてリン酸化を表現する。

【0114】

結果は、50 μ g/mlの濃度で、mAb 15B8が一貫して基底よりも2倍以上大きい最大リン酸化を誘発したことを示した。基底状態からの認識できる増加は、1 μ g/mlまで認知できる。さらに、mAb 15B8は、Tie 2受容体とシグナル伝達タンパクSH-PTP2との会合を1 μ g/ml～50 μ g/mlの範囲にわたって刺激することができた。

【0115】

インビボ脈管形成の測定 - Matrigel可視化モデル

約1週間、マウスの皮膚の下に細胞外マトリックスゲルを置き、次いで、いくつかの測定を用いてゲルの脈管形成性侵略を定量化する（Biancone, L., et al., J. Exp. Med. 186:147, 1997）ことにより、脈管形成をインビボでモデル化する。すなわち、減少した増殖因子、エンドトキシン不含Matrigel（マサチューセッツ州ベッドフォードのベクトン-ディッキンソン（Becton-Dickinson

)) は、低温でゲルである。抗体または既知の脈管形成剤を該ゲルとを、それらが合計容量の2%よりも多くなならないように混合する。8週齢以上のC57雌性マウスに、冷却した注射器による背面皮下注射により、Matrigel 0.5 mlを投与する。生理学的温度にて、液体matrigelは、迅速に固体および凝集ゲルを形成する。6日後、マウスを屠殺し、Matrigelプラグを回収した。Drabkinの方法 (Drabkin, DL and Austin, JH, J Biol Chem 112:51, 1935) (ミズーリ州セントルイスのシグマ (Sigma)) によりゲルのヘモグロビン含有量を分析することにより、または、CD31染色を用いて血管を染色して定量化することにより、脈管形成を定量化する。

【0116】

通常、matrigelは、ほとんど無血管のままである。しかしながら、図1に示すように、mAb 15B8は、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、一貫して、ゲルのヘモグロビン含有量の増加により測定されるように5~8倍の血管侵入の増加を刺激した。不活性であるが高親和性のmAb 11H10、およびアンタゴニストMab, 12H8のいずれも、同濃度で、対照以上に有意に脈管形成を刺激しなかった。塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) および血小板活性化因子 (PAF) などの既知の正の対照は、これらの同一実験において脈管形成を誘発する。

【0117】

内皮細胞生存

継代2~12のヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) (ワシントン州カークランドのセル・システムズ) を細胞 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個/ウェルの密度で、10%ウシ胎児血清 (ハイクロン (Hyclone)) および内皮細胞増殖因子 (シグマ) で補足したCS-C培地 (セル・システムズ) 中、6ウェルプレートにプレATINGした。24~48時間後、培地を、1~2%血清だけで補足したCS-C培地と交換し、細胞を一夜培養し、翌日、アッセイに用いた。生存研究のために、それらを所定の濃度の抗体で処理し、無血清培地中でさらなる時間培養し、次いで、目視検査およびトリパンブルー色素排除により細胞生存率について評価した。

【0118】

HUVEC細胞は、環境条件に対して激しく敏感であり、ウシ胎児血清以外に培養培地において増殖因子（例えば、aFGF）の添加を必要とする。かかる因子および血清の不在下では、該細胞は、感知できるほどには増殖しないであろうし、急速に細胞死を受けるであろう。本発明者らの系では、最小培地中で一夜培養された細胞は、有意な罹患率を示し、24時間以内にほとんど100%が生存不可能となる。

【0119】

この結果は、mAb 15B8が内皮細胞の生存を促進することを示している。50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体15B8の添加は、48時間にわたって生存の増強を促進した。該細胞は、付着したままであり、内皮の形態を保持していた。

【0120】

したがって、Tie2は、内皮を安定化するのに重要な役割を果たすことができる。アゴニストmAbで処理することによる栄養素および増殖因子減少培地中のHUVECにおけるTie2受容体の刺激は、同様に培養した対照細胞を超えて生存率を増強させた。基質への付着および細胞の形態もまた保持された。哺乳動物におけるTie2受容体の刺激は、存在する血管構造の生存率を増加させ、虚血性発作の影響を減少させる。哺乳動物を処置するのに用いた抗体の量の決定は、当業者の理解し得る範囲内である。

【0121】

UT7 (GM-CSF) 細胞の増殖

巨核球、それらの前駆細胞およびUT7のごとき骨髓巨核球性白血病細胞は、Tie2受容体を発現する。GM-CSF依存性細胞系UT7 (GM-CSF) を10% FCS含有Iscove改変Dulbecco培地に細胞 5×10^4 個/ ml でプレーティングした。GM-CSFを10 ng/ml （最適）または5 ng/ml （最適下）のいずれかで使用し、Tie2アゴニストmAb 15B8を1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で使用した。24、48および72時間目に、細胞試料を培養物から取り出し、計数した。

【0122】

アゴニストmAb 15B8単独では、サイトカイン依存性造血細胞系UT7 (GM-CSF) の増殖に影響を及ぼさなかった。しかしながら、15B8 mAbは、最適下量のGM-CSFと相乗作用して、培養の24および48時間目にUT7 (GM-CSF) 細胞数を増加させた。哺乳動物におけるTie2受容体の刺激は、インビボで巨核球前駆細胞を包含する造血細胞の増殖を増加させ、そのことにより産生される赤血球および血小板の数が増加するであろう。哺乳動物を処置するのに用いる抗体の量の決定は、当業者の理解し得る範囲内である。

【0123】

実施例3

抗TIE2キナーゼ受容体モノクローナル抗体軽鎖および重鎖cDNAのクローニングおよび配列決定

タンパクマイクロシーケンシング法により、抗-TIE2キナーゼ受容体mAb 15B8の軽鎖および重鎖のN末端アミノ酸配列を決定した。最初に、ピログルタミン酸アミノペプチダーゼを用いて、ピログルタミン酸によりブロックされたN末端を酵素的に脱ブロックした。

【0124】

全15B8ハイブリドーマRNAを精製し、逆転写し、PCR増幅した。重鎖に関して、マウスIgGCH1特異的プライマーおよびN末端タンパク配列をベースとする変性プライマーを用いて、RNA/DNAハイブリッドをPCR増幅した。同様に、軽鎖に関して、マウスCカッパプライマーおよびN末端タンパク配列をベースとする変性プライマーを用いて、RNA/DNAハイブリッドを増幅した。適当なサイズ、すなわち、~350残基のPCR生成物をプラスミドベクター中にクローン化し、サンガー法の変法により配列決定した。各場合において、VHおよびVkクロンの配列を比較して、それぞれコンセンサス15B8重鎖可変領域配列（配列番号1および2）ならびにコンセンサス15B8軽鎖可変領域配列（配列番号3および4）を得た。重鎖CDR1、2および3アミノ酸配列をそれぞれ配列番号5、6および7に示す。軽鎖CDR1、2および3アミノ酸配列をそれぞれ配列番号8、9および10に示す。

【0125】

タンパクマイクロシーケンシング法により、抗-TIE2キナーゼ受容体mAb 13H10の軽鎖のN末端アミノ酸配列を決定した。最初に、ピログルタミン酸アミノペプチダーゼを用いて、ピログルタミン酸によりブロックされたN末端を酵素的に脱ブロックした。

【0126】

全13H10ハイブリドーマRNAを精製し、逆転写し、PCR増幅した。重鎖に関して、マウスIgGCH1特異的プライマーおよびN末端タンパク配列をベースとする変性プライマーを用いて、RNA/DNAハイブリッドをPCR増幅した。軽鎖に関して、マウスCカッププライマーおよび万能変性プライマーを用いて、RNA/DNAハイブリッドを増幅した。適当なサイズ、すなわち、～350残基のPCR生成物をプラスミドベクター中にクローン化し、サンガー法の変法により配列決定した。重鎖のN末端アミノ酸配列を上記したように決定し、VHクローンを比較して、コンセンサス13H10重鎖可変領域配列を得た。配列番号11および12は、アミノ酸7で始まる13H10重鎖可変領域配列を示す。配列番号21は、13H10重鎖可変領域の完全アミノ酸配列を示す。Vkクローンの比較により、それぞれコンセンサス13H10軽鎖可変領域配列（配列番号13および14）を得た。重鎖CDR1、2および3アミノ酸配列をそれぞれ配列番号15、16および17に示す。軽鎖CDR1、2および3アミノ酸配列をそれぞれ配列番号18、19および20に示す。

【0127】

本発明は、本発明の精神または必須の属性から逸脱することなく他の特別な形態において具体化してもよく、したがって、本発明の範囲を示すものとして、上記明細書よりもむしろ添付した請求の範囲に関して言及されるべきである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Connie L. Erickson-Miller
 Stephen D. Holmes
 James D. Winkler

<120> TIE2 Agonist Antibodies

<130> P50843

<150> 60/102,098

<151> 1998-09-28

<160> 21

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(357)

<223> 15B8 heavy chain v region

<400> 1

caa gtt cag ctg cag cag cct ggg gtt gta ctt gtg atg cct ggg gct
 48

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Val	Val	Leu	Val	Met	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	

tca gtg aag ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc gcc agc tac
 96

Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ala	Ser	Tyr
				20					25					30	

tgg atg cac tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ctt gag tgg atc
 144

Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

35 40 45

gga gag att gat cct tct gat agt tat cgt aac tac aat caa aag ttc
192
Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Arg Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gtc aat
240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Asn
65 70 75 80

atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt
288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca aag acg tcg gga ata ggg agg gct atg gac tac tgg ggt caa gga
336
Ala Lys Thr Ser Gly Ile Gly Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

acc tca gtc acc gtc tcc tca
357
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Val Val Leu Val Met Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Ser Tyr
20 25 30
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Arg Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Asn

```
<210> 3
<211> 321
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(321)
<223> 15B8 light chain v region
```

- 45 -

gaa gat ttt ggg act tat tac tgt caa cat cat tat agt atc ccg tac

288

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Ser Ile Pro Tyr

85

90

95

acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gag atg aga

321

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Arg

100

105

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Asp Ile Gln Met Ile Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Phe

20

25

30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

35

40

45

Phe Asn Ala Lys Asn Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Ser Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asp Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Ser Ile Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Arg

100

105

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> SITE

<222> (1)...(5)

<223> 15B8 heavy chain CDR 1

<400> 5
 Ser Tyr Trp Met His
 1 5

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)...(17)
 <223> 15B8 heavy chain CDR 2

<400> 6
 Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Arg Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)...(10)
 <223> 15B8 heavy chain CDR 3

<400> 7
 Thr Ser Gly Ile Gly Arg Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)...(11)
 <223> 15B8 light chain CDR 1

<400> 8
 Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Phe Val Thr
 1 5 10

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)...(7)
 <223> 15B8 light chain CDR 2

<400> 9
 Asn Ala Lys Asn Leu Val Glu
 1 5

<210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)...(9)
 <223> 15B8 light chain CDR 3

<400> 10
 Gln His His Tyr Ser Ile Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 11
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(336)
 <223> 13H10 heavy chain v region beginning at amino acid
 7

<400> 11

tct gga cct gaa ctg aag aag cct gga gag aca gtc aag atc tcc tgc
48

Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys
1 5 10 15

aag gct tct ggt tat acc ttc aca gac ttt tca ata cac tgg gtg aag
96

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe Ser Ile His Trp Val Lys
20 25 30

cag gct cca gga aag ggt tta aag tgg atg ggc tgg ata aac act gag
144

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu
35 40 45

act ggt gag aca aca tat gca gaa gac ttc aag gga cgg ttt gcc ttc
192

Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Glu Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe
50 55 60

tct ttg gaa acc tct gcc agc act gcc tac ttg caa atc aac aac ctc
240

Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu
65 70 75 80

aaa aat gag gac acg gct aca tat ttt tgt agt aga agg tat gat tac
288

Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ser Arg Arg Tyr Asp Tyr
85 90 95

gac acc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct
336

Asp Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12
 Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys
 1 5 10 15
 Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe Ser Ile His Trp Val Lys
 20 25 30
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu
 35 40 45
 Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Glu Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe
 50 55 60
 Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu
 65 70 75 80
 Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ser Arg Arg Tyr Asp Tyr
 85 90 95
 Asp Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

<210> 13

<211> 339

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(339)

<223> 13H10 light chain v region

<400> 13

gat atc gtg atg act cag gct gca ctc tct gta cct gtc act cct gga
 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Leu Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 gag tca gta tcc atc tcc tgc agg tgc agt agt agt ctc ctg cat aga
 96
 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Ser Ser Leu Leu His Arg
 20 25 30
 aat ggc aac act tac ttg tat tgg ttc ctg cag agg cca ggg cag tct
 144
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cct cag ctc ctg ata tat cgg atg tcc aac ctt gcc tca gga gtc cca
192

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt ggg tca gga act gct ttc aca ctg aga atc
240

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

agt aga gtg gag gct gag gat gtg ggt gtt tat tac tgt atg caa cgt
288

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Arg
85 90 95

cta gaa tat cct ttc acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa
336

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

cgg

339

Arg

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Leu Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Ser Ser Leu Leu His Arg
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Arg
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

	100	105	110
<210>	15		
<211>	5		
<212>	PRT		
<213>	Mus musculus		
<220>			
<221>	SITE		
<222>	{1}...(5)		
<223>	heavy chain CDR 1		
<400>	15		
Asp Phe Ser Ile His			
1	5		
<210>	16		
<211>	17		
<212>	PRT		
<213>	Mus musculus		
<220>			
<221>	SITE		
<222>	{1}...(17)		
<223>	heavy chain CDR 2		
<400>	16		
Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Glu Asp Phe Lys			
1	5	10	15
Gly			
<210>	17		
<211>	10		
<212>	PRT		
<213>	Mus musculus		
<220>			
<221>	SITE		
<222>	{1}...(10)		
<223>	heavy chain CDR 3		
<400>	17		

Arg Tyr Asp Tyr Asp Thr Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)...(16)
 <223> light chain CDR 1

<400> 18

Arg Ser Ser Ser Ser Leu Leu His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)...(7)
 <223> light chain CDR 2

<400> 19

Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)...(9)
 <223> light chain CDR 3

<400> 20

Met Gln Arg Leu Glu Tyr Pro Phe Thr

1

5

<210> 21
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)...(118)
 <223> Complete 13H10 heavy chain v region

<400> 21

Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
1				5					10					15	
Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Phe
			20					25					30		
Ser	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Lys	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Gly	Glu	Thr	Thr	Tyr	Ala	Glu	Asp	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Leu	Gln	Ile	Asn	Asn	Leu	Lys	Asn	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys
			85					90					95		
Ser	Arg	Arg	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Thr	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser										
															115

【図面の簡単な説明】

【図1】 Matrigel 血管新生モデルにおけるモノクローナル抗体 15B8 の活性を示す実験結果のグラフである。

【図1】

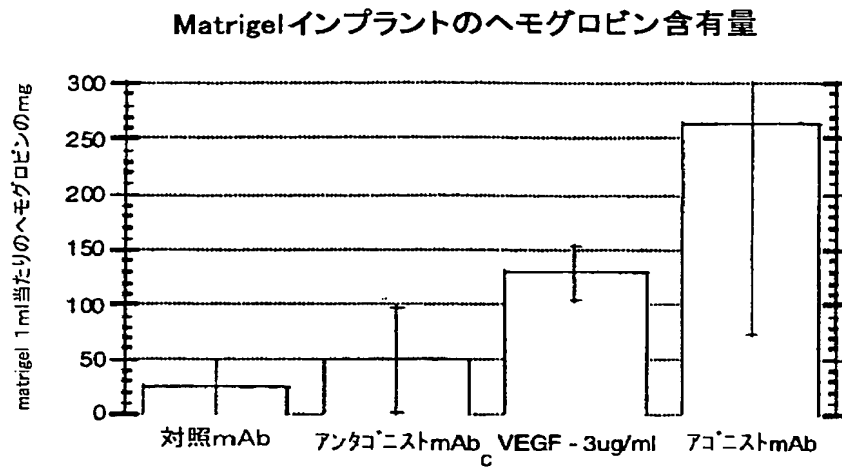


Fig. 1

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US99/22428
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : CO7K 16/28, 14/00; C12N 15/11; A61K 39/393; C12N 15/83 US CL : 530/388.22,350; 536/23.1; 424/143.1; 435/326 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/388.22,350; 536/23.1; 424/143.1; 435/326 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN/CAS Online, Medline, Patents, CAPLUS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 854 185 A2 (LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 02 August 1998, entire patent, especially page 7 lines 10-25.	1-7,22-25
X - Y	KOBLIZEK et al. Tie2 receptor expression and phosphorylation in cultured cells and mouse tissues. Eur. J. Biochem. 1997, Vol. 244, pages 774-779, especially page 774 column 2 lines 3-6 and page 778 column 1 lines 6-10.	1-3, 22, 24-26 ----- 4-9, 23, 27-34
X,E	US 5,955,291 A (ALITALO et al.) 21 September 1999, Column 2 lines 25-67 and columns 3 and 4 and column 5 lines 1-7.	1-9, 22-34
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 NOVEMBER 1999		Date of mailing of the international search report 19 NOV 1999
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer AMY DECLOUX Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/22428

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SATO, A.M. et al. tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. Proc. Natl. Aci. Sci. October 1993, Vol. 90, pages 9355-9358.	
A	SCHNURCH et al. Expression of tie-2, a member of a novel family of tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. Development. 1993, Vol. 119, pages 957-968.	
A	PARTANEN et al. A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. Molecular and Cellular Biology. April 1992, Vol. 12, No. 4, pages 1698-1707.	
A	KORHONEN et al. Enhanced Expression of the tie recepto tyrosine kinase in endothelial cells during neovascularization. Blood. 15 November 1992, Vol. 80, No. 10, pages 2548-2555.	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet)(July 1992)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/21428

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 10-21
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims 10-21 encompass Sequences, and the presentation of the sequence data does not comply with requirements for sequence disclosures.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet(1))(July 1992)*

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
A 6 1 P 9/10		C 0 7 K 16/28	4 H 0 4 5
43/00	1 0 7	C 1 2 P 21/08	
C 0 7 K 16/28		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 5/10			C
15/02		5/00	B
C 1 2 P 21/08		A 6 1 K 37/02	
(71) 出願人	スミスクライン・ビーチャム・パブリック・リミテッド・カンパニー SmithKline Beecham p. l. c. イギリス国ミドルセックス・ティーダブリュ ユ8・9イービー、ブレンフォード、ニュー・ホライズンズ・コート		
(72) 発明者	スティーブン・ディ・ホームズ イギリス、シーエム19・5エイダブリュ ー、エセックス、ハーロウ、サード・アベ ニュー、ニュー・フロンティアーズ・サイ エンス・パーク・サウス		
(72) 発明者	コニー・エル・エリクソン-ミラー アメリカ合衆国19341ペンシルベニア州エ クストン、プレイナード・プレイス608番		
(72) 発明者	ジェイムズ・ディ・ウィンクラ アメリカ合衆国19034ペンシルベニア州フ ォート・ワシントン、ハートランフト・ア ベニュー701番		
F ターム (参考)	4B024 AA01 AA11 BA43 BA44 CA04 CA07 DA03 GA03 GA27 HA03 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC01 CC24 DA01 DA13 4B065 AA91X AA91Y AA93X AA93Y AB01 AB05 AC14 BA01 BA08 BA24 BD50 CA25 CA44 CA46 4C084 AA01 AA07 BA01 CA23 MA01 NA14 4C085 AA14 BB31 CC05 CC07 DD22 DD88 EE01 4H045 AA11 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA72 FA74 GA26		